

· 论 文 ·

罗丹宁衍生物的合成及抗肿瘤活性

楚小晶, 张 英, 乔春华, 敖桂珍*, 杨圣伟, 董 燕

(苏州大学医学部药学院, 苏州 215123)

摘 要 在罗丹宁衍生物 WL-276 的基础上设计并合成一系列新的罗丹宁衍生物, 并对这些化合物的抗肿瘤活性进行测定。以氨基酸为原料, 经环合和缩合反应, 合成了化合物 II_{1,4}, 然后分别与硫化氢供体 ADT-OH 偶联得到化合物 III_{1,4}, 共合成了 8 个目标化合物, 其中 4 个未见报道, 其结构均经 ¹H NMR、IR 和 HR-MS 确证。然后用 MTT 法筛选其抗肿瘤活性。初步研究表明, 化合物 II_{1,3,4} 和 III_{1,4} 对 HepG2 肿瘤细胞和 DU145 肿瘤细胞的增殖均具有较强的抑制作用, 且化合物 III 的活性比 II 强; 化合物 III_{2,4} 对 HepG2 细胞和化合物 III_{1,2,4} 对 DU145 细胞的抗增殖活性均高于阳性对照 5-氟尿嘧啶。

关键词 罗丹宁衍生物; 合成; 硫化氢供体; 抗肿瘤活性

中图分类号 R914.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)02-0113-04

Synthesis and anti-tumor activity of rhodanine derivatives

CHU Xiaojing, ZHANG Ying, QIAO Chunhua, AO Guizhen*, YANG Shengwei, DONG Yan

School of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract Based on the study of rhodanine derivative WL-276, some novel compounds were synthesized, and their anti-tumor effects were screened by MTT method. Compounds II_{1,4} were obtained by cyclization and condensation from the certain amino acids, and then coupled respectively with hydrogen sulfide donor ADT-OH to afford compounds III_{1,4}, whose structures were confirmed by ¹H NMR, IR and HR-MS. Furthermore, preliminary pharmacological results suggested that compounds II_{1,3,4}, III_{1,4} had strong inhibitory effects on the proliferation of HepG2 and DU145 tumor cells. Particularly, the anti-proliferation activity of compounds III_{2,4} on HepG2 and compounds III_{1,2,4} on DU145 tumor cells was stronger than that of the positive control, 5-fluorouracil.

Key words rhodanine derivatives; synthesis; H₂S donor; anti-tumor activity

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for Novel Drugs (No. 2009ZX09103-129); the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions; and Foundation of Soochow University Students' Innovation Program (No. 5731513010)

近年来大量研究表明, Bcl-2 蛋白是控制细胞凋亡的最终调节者, 其超量表达所致的细胞不适当生存可能是肿瘤形成和化疗耐药的主要原因之一, 以 Bcl-2 蛋白为靶点设计开发抗肿瘤药物逐渐成为目前研究的热点^[1]。Wang 等^[2]合成罗丹宁衍生物 WL-276 (图 1), 不但对 Bcl-2 具有抑制作用, 且对耐药性前列腺癌 PC-3 细胞表现出较强的抑制活性。

内源性硫化氢 (H₂S) 在神经系统、循环系统和消化系统具有重要生理效应, 其代谢异常与许多疾

病有关, 被称为继一氧化氮和一氧化碳后的第 3 种气体信号分子。外源性 H₂S 供体 NaHS 可抑制 T 淋巴细胞、人胚肾细胞 HEK-293 等的增殖和刺激淋巴细胞等的凋亡^[3], 但是半衰期很短, 而 5-对羟基苯基-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮 (ADT-OH) 是一种缓慢释放 H₂S 的化合物。因此, 以氨基酸为原料, 经环合、缩合, 合成了类化合物 II_{1,4}, 再分别与 ADT-OH 偶联, 得到了化合物 III, 并考察这些化合物的抗肿瘤活性。合成路线见图 2。

* 收稿日期 2012-10-22 * 通信作者 Tel: 13812781680 E-mail: aoguizhen2012@sohu.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2009ZX09103-129); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 苏州大学大学生创新性实验基金资助项目 (No. 5731513010)

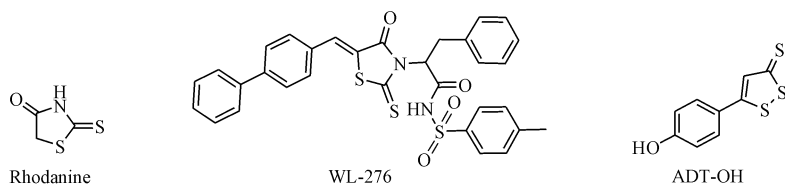


Figure 1 Chemicals structures of WL-276, rhodanine and ADT-OH

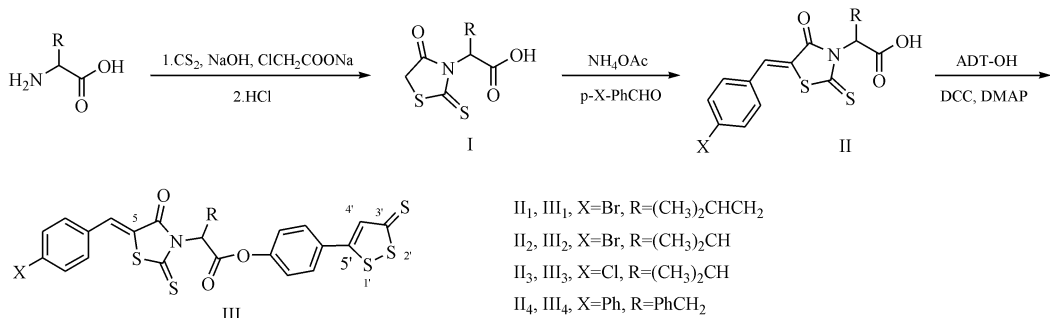


Figure 2 Synthetic route of rhodanine derivatives

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Nicolet Avatar 360 FTIR 型红外光谱仪; Varian Unity Inova 400 MHz 型核磁共振仪; Agilent 6220 LC/MSD TOF 液质联用仪; XT5 显微熔点仪(温度未经校正); 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

人肝癌 HepG2 细胞株和人前列腺癌 DU145 细胞株(苏州大学药学院药物化学实验室乔春华教授提供); RPMI-1640 培养基和四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 广州化学试剂厂); 胰蛋白酶(吉诺生物医药技术有限公司); 化合物 I 参考文献[4]的方法制备合成。所用化学试剂均为市售分析纯。

1.2 目标化合物的合成

1.2.1 化合物 II 的合成 化合物 II₁₋₄ 参考文献[5]的方法制备合成。

1.2.2 化合物 III₁₋₄ 的合成 将化合物 II₁ (500 mg, 1.2 mmol)、DCC (299 mg, 1.5 mmol)、ADT-OH (326 mg, 1.4 mmol) 及催化量的 DMAP 溶于二氯甲烷 20 mL 中, 室温搅拌 30 min, 过滤。滤饼用乙酸乙酯-石油醚重结晶。用类似方法合成化合物 III₂₋₄。

化合物 III₁: 红色固体, 产率 69.8%, 熔点 187.2 ~ 188.6 °C。¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.98 (d, 3H, J = 6.6 Hz, CH₃), 1.04 (d, 3H, J = 6.5 Hz, CH₃), 1.59 ~ 1.68 (m, 1H, CH), 2.21 ~ 2.36 (m, 2H, CH₂), 5.59 ~ 5.95 (m, 1H, CH), 7.22 (d, 2H, J = 8.5

Hz, ArH), 7.37 (d, 2H, J = 8.6 Hz, ArH), 7.39 (s, 1H, =CH), 7.64 (d, 2H, J = 8.6 Hz, ArH), 7.67 (d, 2H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.70 (s, 1H, =CH)。IR (KBr, ν, cm⁻¹): 1 769.9 (C=O), 1 711.0 (C=O), 1 600.8 (C=C), 1 581.9 (C=C); HR-MS m/z: Calcd. for C₂₅H₂₀BrNO₃S₅ [M + H]⁺: 621.930 3, Found: 621.928 0。

化合物 III₂: 红色固体, 产率 73.4%, 熔点 159.5 ~ 160.7 °C。¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.91 (d, 3H, J = 6.9 Hz, CH₃), 1.33 (d, 3H, J = 6.5 Hz, CH₃), 2.94 ~ 3.05 (m, 1H, CH), 5.52 (d, 1H, J = 9.4 Hz, CH), 7.21 (d, 2H, J = 8.6 Hz, ArH), 7.37 ~ 7.39 (m, 3H, ArH, =CH), 7.63 ~ 7.67 (m, 4H, ArH), 7.72 (s, 1H, =CH)。IR (KBr, ν, cm⁻¹): 1 777.3 (C=O), 1 706.4 (C=O), 1 601.1 (C=C), 1 582.2 (C=C); HR-MS m/z: Calcd. for C₂₄H₁₈BrNO₃S₅ [M + H]⁺: 607.914 6, Found: 607.912 2。

化合物 III₃: 红色固体, 产率 70.1%, 熔点 164.3 ~ 165.2 °C。¹H NMR (CDCl₃) δ: 0.91 (d, 3H, J = 6.9 Hz, CH₃), 1.33 (d, 3H, J = 6.5 Hz, CH₃), 2.94 ~ 3.03 (m, 1H, CH), 5.52 (d, 1H, J = 8.6 Hz, CH), 7.21 (d, 2H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.38 (s, 1H, =CH), 7.44 ~ 7.49 (m, 4H, ArH), 7.66 (d, 2H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.74 (s, 1H, =CH)。IR (KBr, ν, cm⁻¹): 1 777.0 (C=O), 1 704.4 (C=O), 1 601.6 (C=C), 1 583.3 (C=C); HR-MS m/z: Calcd. for

C₂₄ H₁₈ ClNO₃S₅ [M + H]⁺: 563.965 2, Found: 563.964 4。

化合物 III₄: 红色固体, 产率 68.5%, 熔点 168.4 ~ 171.4 °C。¹H NMR(CDCl₃) δ: 3.55 ~ 3.65 (m, 2H, CH₂), 6.27 ~ 6.32 (m, 1H, CH), 7.17 ~ 7.30 (m, 5H, ArH), 7.29 (d, 2H, J = 8.7 Hz, ArH), 7.41 (d, 1H, J = 7.1 Hz, ArH), 7.46 ~ 7.51 (m, 2H, ArH, =CH), 7.71 ~ 7.75 (m, 4H, ArH), 7.80 (s, 1H, =CH), 7.87 (t, 3H, J = 7.7 Hz, ArH), 7.99 (d, 2H, J = 8.7 Hz, ArH)。1 771.3 (C = O), 1 704.6 (C = O), 1 590.5 (C = C), 1 520.7 (C = C); HR-MS *m/z*: Calcd. for C₃₄H₂₃NO₃S₅ [M + H]⁺: 654.035 4, Found: 654.034 6。

1.3 抗肿瘤活性试验

1.3.1 药液配制 化合物先用 DMSO 溶解, 再用培养基稀释成所需浓度, 每个化合物设 6 个浓度 (1, 10, 20, 40, 80, 160 μmol/L)。采用 MTT 法对所合成的化合物进行体外抗肿瘤活性评价, 以 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 作为阳性对照。

1.3.2 细胞培养 人前列腺癌 DU145 细胞和人肝癌细胞 HepG2 均生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育。

1.3.3 实验步骤 取对数生长期、状态良好的细胞 1 瓶, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化, 使贴壁细胞脱落, 制成每毫升含 5 × 10⁶ ~ 6 × 10⁶ 个细胞的悬液。取细胞悬液接种于 96 孔板上, 每孔 50 μL。置恒温 CO₂ 培养箱中培养 24 h。换液, 加入受试化合物, 每孔 50 μL。设阴性对照组、空白对照组和实验组, 每组设 5 个复孔, 培养 48 h。将 MTT 溶液 (5 mg/mL) 加入 96 孔板中, 每孔 20 μL, 培养箱中反应 4 h。将培养液吸掉, 加入 DMSO, 每孔 150 μL。用酶联免疫测试仪在波长 570 nm 处测定每孔的吸收度 (*A*), 计算细胞抑制率。每次实验重复 3 次。增殖抑制率 (%) = [1 - (试验组 *A* - 空白组 *A*) / (对照组 *A* - 空白组 *A*)] × 100。

2 结果与讨论

2.1 化合物 III 的合成 合成化合物 III 时, 曾采用两种方法进行。一是采用酰氯法, 将化合物 II 用二氯亚砷生成相应的酰氯化合物; 二是采用 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺或 *N,N'*-羰基二咪唑作为缩合剂, 化合物 II 直接与 ADT-OH 反应。

但是这些方法反应很不完全, 产率均很低。最后选择了 *N,N'*-二环己基碳二亚胺 (DCC) 作为缩合剂, 并加入 4-二甲氨基吡啶作为催化剂, 产率与反应时间有关。以化合物 III₁ 的合成为例, 产率随时间的增加 (10, 20, 30, 40, 50 min), 相对应的产率 (19.3%、47.5%、69.8%、50.3%、23.4%) 先升高后降低, 从检测数据可以看出反应时间 30 min 时收率最大。超过 30 min 后, 有少量的副产物产生, 推测可能为酯键水解的产物。

2.2 目标化合物的抗肿瘤活性 采用 MTT 法评价 8 个目标化合物对人肝癌 HepG2 细胞株和人前列腺癌 DU145 细胞株增殖作用的影响, 结果见表 1。

Table 1 Inhibitory effect of the target compounds on HepG2 and DU145 tumor cells

Compd.	IC ₅₀ / (μmol/L)		Compd.	IC ₅₀ / (μmol/L)	
	HepG2	DU145		HepG2	DU145
II ₁	65.80	48.10	III ₁	26.65	0.25
II ₂	>100	81.10	III ₂	11.03	2.46
II ₃	20.42	48.70	III ₃	42.75	21.26
II ₄	62.00	52.20	III ₄	2.11	5.33
5-FU	17.56	10.45	5-FU	17.56	10.45

药理初筛结果表明: ①除化合物 II₂ 外, 化合物 II₁, II₃, II₄ 对 HepG2 细胞和 DU145 细胞的增殖均具有较强的抑制作用; ②偶联物 III_{1,4} 对 HepG2 细胞和 DU145 细胞的增殖均具有较强的抑制作用, 且对 DU145 细胞抑制活性更强; ③化合物 II_{1,4} 经与 ADT-OH 偶联后, 得到的 III_{1,4} 对 HepG2 细胞和 DU145 细胞增殖抑制活性增强。④化合物 II 的抗肿瘤活性均比阳性对照药 5-FU 弱; 而 III 类化合物中, 化合物 III_{2,4} 对 HepG2 细胞抑制作用比 5-FU 强, 化合物 III_{1,2,4} 抑制 DU145 细胞增殖活性比 5-FU 强。

文献[6]报道, NaHS 可引起 DNA 损伤, 作用机制是稳定 p53 以及诱导下游凋亡蛋白如 p21, Bax 和细胞色素 C 水平, 但不上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平。最新研究发现 NSAIDs 与 ADT-OH 的偶联物具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡作用, 对肿瘤细胞抑制作用增强 28 ~ 3 000 倍^[7-9]。正因为 H₂S 供体具有上调促凋亡蛋白 Bax 水平的作用, 因此将 H₂S 供体 ADT-OH 和 Bcl-2 抑制剂罗丹宁衍生物偶联, 结果不但产生预期的抗肿瘤作用, 且偶联后化合物的抗肿瘤活性得到明显提高。

参考文献

- [1] Doshi JM, Tian D, Xing C. Structure activity relationship studies of ethyl 2-amino-6-bromo 4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl) 4H-chromene-3-carboxylate (HA14-1), an antagonist for anti-apoptotic Bcl-2 proteins to overcome drug resistance in cancer [J]. *J Med Chem*, 2006, **49**(26): 7 731 – 7 739.
- [2] Wang L, Sloper DT, Addo SN, *et al.* WL-276, an antagonist against Bcl-2 proteins, over-comes drug resistance and suppresses prostate tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(11): 4 377 – 4 383.
- [3] Yang GD, Wang R. H₂S and cellular proliferation and apoptosis [J]. *Acta Physiol Sin*, 2007, **59**(2): 133 – 140.
- [4] Chai CL, Bernardo PH, XU J, *et al.* Biarylthodanine and pyridylthodanine derivatives as Bcl-2 and Mcl-1 inhibitors and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of cancer; WO, 2010024783 [P]. 2010-03-04.
- [5] Qiao CH, Wang LY. The preparation and applications of the rhodanine derivatives (一种绕丹宁衍生物、其制备方法及其应用); CN, 101367775 [P]. 2009-02-18.
- [6] Baskar R, Li L, Moore PK. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells [J]. *FASEB J*, 2007, **21**(1): 247 – 255.
- [7] Chattopadhyay M, Kodela R, Nath N, *et al.* Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF- κ B signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, **83**(6): 723 – 732.
- [8] Chattopadhyay M, Kodela R, Nath N, *et al.* Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs inhibit the growth of cultured human cancer cells; a general property and evidence of a tissue type-independent effect [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, **83**(6): 715 – 722.
- [9] Ravinder K, Mitali C, Khosrow K. NOSH-aspirin: a novel nitric oxide-hydrogen sulfide-releasing hybrid; a new class of anti-inflammatory pharmaceuticals [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, **3**(3): 257 – 262.

· 新 信 息 ·

2012 年最畅销的 20 个药物(1)

1 修美乐 Humira(阿达木单抗) 生产商: Abbvie

适应证: 中度至重度类风湿关节炎, 中度至重度慢性斑块型银屑病, 中度至重度克罗恩病; 中度至重度溃疡性结肠炎, 强直性脊柱炎, 银屑病关节炎, 中度至重度多关节型幼年特发性关节炎。

2 舒利迭 Advair, Seretide(氟替卡松和沙美特罗) 生产商: 葛兰素史克(GlaxoSmithKline)

适应证: 哮喘和慢性阻塞性肺病, 包括慢性支气管炎和肺气肿。

3 美罗华 Rituxan, MabThera(利妥昔单抗) 生产商: 罗氏(Roche)

适应证: 非霍奇金淋巴瘤, 慢性淋巴细胞白血病, 以及类风湿关节炎。

4 来得时 Lantus(甘精胰岛素) 生产商: 赛诺菲(Sanofi)

适应证: 治疗糖尿病。

5 赫赛汀 Herceptin(曲妥珠单抗) 生产商: 罗氏(Roche)

适应证: HER2 阳性的乳腺癌和 HER2 阳性的转移性胃癌。

6 可定 Crestor(瑞舒伐他汀钙) 生产商: 阿斯利康(AstraZeneca)

适应证: 作为控制饮食的辅助治疗, 降低血液中的总胆固醇, 低密度脂蛋白胆固醇, 载脂蛋白 B, 非高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯。

7 类克 Remicade(英夫利西单抗) 生产商: 强生(Johnson&Johnson)

适应证: 与甲氨喋呤联用, 用于成年患者中度至重度活动性类风湿关节炎; 之前对其他药物无应答的 6 岁及以上儿童和成年克罗恩病患者; 类风湿关节炎, 强直性脊柱炎, 银屑病关节炎; 慢性、严重、广泛性和/或丧失活动能力的斑块型银屑病成年患者; 对其他治疗药物没有良好应答的 6 岁及以上儿童和成年患者中度至中度活动性溃疡性结肠炎。

8 安维汀 Avastin(贝伐珠单抗) 生产商: 罗氏(Roche)

适应证: 转移性结直肠癌(大肠癌)、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤及转移性肾癌。

9 欣百达 Cymbalta(度洛西汀) 生产商: 礼来(Eli Lilly)

适应证: 重度抑郁症、广泛性焦虑症、糖尿病周围神经性疼痛和纤维肌痛; 慢性骨关节炎疼痛引起的慢性肌肉骨骼疼痛以及慢性腰痛。

10 波立维 Plavix(氯吡格雷) 生产商: 赛诺菲(Sanofi)和百时美施贵宝(Bristol-Myers Squibb)

适应证: 急性冠脉综合征、近期心肌梗死、近期中风或者已存在的周围动脉疾病。

(生物谷, 本刊有删节)